

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EPO - DG 1
EJU
09. 01. 2001
REC'D 17 JAN 2001
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

05/04
#478

Aktenzeichen:

199 46 546.0

Anmeldetag:

28. September 1999

Anmelder/Inhaber:

Evotec BioSystems AG, Hamburg/DE

Bezeichnung:

Quantitative Analyse und Typisierung subzellulärer
Partikel mittels SIFT

IPC:

G 01 N 33/50

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 13. November 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wz.

Quantitative Analyse und Typisierung subzellulärer Partikel mittels SIFT

1. Prionkrankheiten

Der Einsatzbereich des vorliegenden Verfahrens ist die Diagnostik von Prionkrankheiten und Typisierung verschiedener Erregerstämme. Die Prionkrankheiten oder transmissiblen spongiformen Enzephalopathien stellen eine Gruppe übertragbarer neurodegenerativer Krankheiten bei Mensch und Tier dar, zu der die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen sowie Scrapie beim Schaf und BSE beim Rind gehören. Prionerkrankungen sind charakterisiert durch die Ablagerung einer aggregierten, pathologischen Form des Prionproteins (PrP) im Gehirngewebe betroffener Individuen, die als PrP^{Sc} bezeichnet wird. Grundsätzlich sind Prionerkrankungen übertragbar, das übertragbare Agens wird als "Prion" bezeichnet. Es wird angenommen, dass PrP^{Sc} der entscheidende, wenn nicht sogar der einzige Bestandteil des Prions ist. Eine erregerassoziierte Nukleinsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Das krankheits- und infektiösitätsassoziierte PrP^{Sc} unterscheidet sich von der physiologisch im Organismus vorkommenden Form des Prionproteins (PrP^C) durch seine Konformation, insbesondere seinen hohen Anteil an β -Faltblattstruktur, seine relative Resistenz gegenüber Protease K und seine Neigung zur Bildung großer multimerer Aggregate. Es wird im Rahmen der sogenannten Prionhypothese angenommen, dass die PrP^{Sc}-Form mit der PrP^C-Form in Wechselwirkung treten und dabei das körpereigene PrP^C über eine Konformationsänderung in die PrP^{Sc}-Form umwandeln kann. Das so neu entstandene PrP^{Sc} kann dann seinerseits mit weiteren PrP^{Sc} Molekülen in Wechselwirkung treten und diese ebenfalls in PrP^{Sc} umwandeln, so dass sich in einer lawinenartigen Kettenreaktion aus dem körpereigenen PrP^{Sc} große Mengen PrP^{Sc} bilden.

Ein wichtiges Phänomen bei den Prionkrankheiten ist das Auftreten verschiedener Erregerstämme. Erregerstämme unterscheiden sich auch bei Passage in Wirten mit identischem Prionprotein, z.B. in Maus-Inzuchtstämmen, konstant in verschiedenen Eigenschaften wie Inkubationszeit, klinischen Symptomen, Läsionsmuster im Gehirn und Übertragbarkeit auf andere Spezies. Im Rahmen der Prionhypothese bedeutet das Auftreten verschiedener Erregerstämme in Tieren mit gleicher PrP-Aminosäuresequenz, dass verschiedene stabile Formen von PrP^{Sc} existieren müssen, die jeweils PrP^C in die entsprechende pathologische Form umwandeln können. Auch bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen finden sich verschiedene distinkte Unterformen, die sich molekular anhand eines Polymorphismus am Codon 129 des Prionproteingens (*PRNP*) und der Größe des Proteinase K-resistenten Fragmentes des Prionproteins im Westernblot unterscheiden lassen, und mit unterschiedlichen phänotypischen Krankheitsausprägungen assoziiert sind.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das einzelne pathologische Prionproteinaggregate in einem homogenen Assay ultrasensitiv detektierbar macht und die detektierten Aggregate zu charakterisieren und zu typisieren.

2. SIFT ("Scanning for Intensely Fluorescent Targets")

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren vorgeschlagen zur Charakterisierung pathologischer Prionproteine nach Subspezies durch deren Markierung mit Sondenmolekülen, wobei die Bindung mindestens zweier unterschiedlicher Sondenmolekülen an die Prionproteine detektiert wird und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt wird.

Eine vorteilhafte Möglichkeit der Charakterisierung pathologischer Prionproteinaggregate (im folgenden "Zielmoleküle" genannt) ist deren Markierung mit geeig-

neten fluoreszenzmarkierten Sondenmolekülen und die anschließende getrennte Detektion und Analyse einzelner Aggregate. Hierfür dient aufbauend auf einem gerätetechnischen Aufbau zur Zweifarben-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, ein Meßverfahren, das im folgenden als SIFT (Scanning for Intensely Fluorescent Targets) bezeichnet wird. SIFT beruht auf einer zeitaufgelösten Intensitätsanalyse eines Fluoreszenzsignals aus einem offenen Volumenelement, das durch eine konfokale Abbildung eines oder mehrerer in einem Fokus gebündelter Anregungs-LASER definiert wird. Dieses Verfahren unterscheidet sich vom Stand der Technik zur FCS-basierten Amyloid-Aggregat-Detektion (Pitschke et al. 1998) durch folgende Modifikationen:

- a) Quantifizierung des Zielmolekül-bedingten Signalanteils durch Analyse der Intensitäts-Verteilung der gemessenen Fluoreszenz in sukzessive aufgezeichneten Kanälen konstanter Länge (im Mikro- bis Millisekundenbereich), wodurch das sehr intensive Signal der mehrfach markierten Zielmoleküle vom Hintergrundsignal freier Sondenmoleküle abgetrennt werden kann. Alternativ könnte die intensitätsbasierte Abtrennung des Zielmolekül bedingten Signalanteils auch über einen Algorithmus zur Peakdetektion und -analyse erfolgen.
- b) Scannen der Probe durch Erzeugen einer konstanten Relativbewegung zwischen Probe und Fokus Dieses Ziel ist in dem erfindungsgemäßen Meßaufbau durch ein mäanderförmiges Bewegen der in eine Meßkapillare eingefüllten Probe realisiert. In einer weiteren Ausführungsform kann dieser Aspekt auch durch eine Optik, die eine Bewegung des Fokus gestattet oder durch eine Flußkapillare realisiert werden. Das Scannen bewirkt zwei Vorteile:
 1. Das untersuchte Volumen und damit die Meßsensitivität wird erheblich erhöht.
 2. Für große, sehr langsam diffundierende Zielmoleküle wird die mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus nicht mehr durch die Diffusionszeit T_{Diffs} , son-

dem durch die Scangeschwindigkeit bestimmt. Dies ist vorteilhaft, weil im wesentlichen alle Zielmoleküle auf etwa die gleiche Zahl Meßkanäle abgebildet werden. Dadurch wird die Anzahl der sehr intensiven Kanäle ein direktes Maß für die Zahl und Konzentration stark markierter Zielmoleküle.

- c) Verwendung von Antikörpern als Sondenmoleküle. Diese haben im Vergleich zu monomeren Aggregat-Bausteinen den Vorteil, einer geringen Selbstaggregation. Dieser Punkt wird erfindungsgemäß zwar bevorzugt, das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich aber prinzipiell mit jeder spezifisch an das Zielmolekül bindenden fluoreszenzmarkierten Sonde durchführen.
- d) Simultane Analyse zweier oder mehrerer getrennt im selben Volumenelement meßbarer, in verschiedenen Wellenlängenbereichen fluoreszierender Sonden. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäß ermittelten Daten aus Mehrfach-, insbesondere Zweifarbmessungen in einer entsprechend mehrdimensionalen, insbesondere zweidimensionalen Array angeordnet und z.B. als Intensitäts-histogramm dargestellt. Dabei ist die Zahl von Kanälen mit gleichzeitig hohen Werten für die mehreren oder beiden Farben ein Maß für die Zahl und Konzentration spezifisch mit am mehreren, insbesondere zwei unabhängigen Sonden markierter Zielmoleküle ist. Wie schon unter Punkt a) erwähnt, ist hier alternativ eine mehrfarbige Peakanalyse möglich.

3. Quantitative Analyse und Typisierung von pathologischen Prionproteinaggregaten mittels SIFT

Neben der erhöhten Spezifität in der Detektion von Zielmolekülen hat die erfindungsgemäße Methode (zwei- oder mehrfarbiges SIFT, (vgl. 2.)) ein zusätzliches, weitergehendes Potential: Für im wesentlichen jedes detektierte Zielmolekül kann separat die relative Markierungsintensität der verschiedenfarbigen Sonden gemessen

werden. Im Gegensatz zur absoluten Intensität der Einzelfarben ist dieses Markierungsverhältnis bei nahezu deckungsgleichen Volumenelementen für die verschiedenen separat detektierten Farben weitgehend unabhängig von der Route, die das jeweilige Zielmolekül durch das Detektionsvolumen nimmt. Bei einer homogenen Population an Zielmolekülen ist daher das Markierungsverhältnis für alle detektierten Partikel ähnlich, in einem zweidimensionalen Intensitätshistogramm streut daher das Zielmolekül spezifische Signale um eine Gerade, deren Steilheit von der relativen Bindung der zwei analysierten Sondenmoleküle bestimmt wird. Bei der Analyse eines anderen Typs von Zielmolekül mit abweichenden Bindungseigenschaften ergibt sich entsprechend ein anderes Markierungsverhältnis (Figur 1). Die relative Bindung zweier verschiedener Sonden kann somit leicht und schnell in einem homogenen Assay unter definierten Pufferbedingungen ermittelt werden und liefert unter geeigneten Bedingungen einen jeweils charakteristischen Wert für verschiedene Zielmolekültypen.

Im Fall der Prionkrankheiten ist aufgrund des Vorkommens verschiedener, in ihrem biologischen Verhalten unterscheidbarer Erregerstämme (vgl. 1.) auch in Wirten mit identischer PrP-Primärstruktur davon auszugehen, dass verschiedene pathologische Formen von PrP^{Sc} existieren, die sich offenbar nur in ihrer Konformation oder Aggregatstruktur unterscheiden. Durch konformationsabhängig unterschiedliche Antikörperbindung sollten diese verschiedenen Formen oder Prion-Stämme bei Verfügbarkeit geeigneter monoklonaler Antikörper grundsätzlich unterscheidbar sein. So findet sich bei der Untersuchung von gereinigten PrP^{Sc}-Aggregaten von Creutzfeldt-Jakob-Patienten in Abhängigkeit davon, ob es sich um pathologisches Prionprotein vom Typ 1 oder Typ 2 handelt, ein unterschiedliches Bindungsverhalten der monoklonalen Antikörper 12F10 und Pri917. Sowohl beim Menschen als auch im Tierreich ist die Erregerstamm-Typisierung von großer epidemiologischer Bedeutung, hierbei ist von besonderer Relevanz die Identifizierung des BSE-Erregerstammes nach Übertragung auf andere Spezies. Insbesondere beim Men-

schen dürfte darüber hinaus eine Erregertypisierung auch prognostisch und eventuell therapeutisch bedeutsam sein.

Die Typisierung über relative Bindung verschiedener Sondenmoleküle mittels SIFT hat dabei mehrere konzeptionelle Vorteile:

- 1) Da jedes Zielmolekül separat analysiert wird, können grundsätzlich auch Mischungen verschiedener Zielmoleküle untersucht und das Mengenverhältnis der Komponenten bestimmt werden.
- 2) Zur Typisierung genügen Sonden mit einer mäßig unterschiedlichen Affinität zu den verschiedenen Zielmolekültypen, eine Alles-oder-Nichts-Bindung ist nicht erforderlich.
- 3) Aus der Zugänglichkeit verschiedener, von unterschiedlichen Sondenmolekülen erkannter Epitope bei unterschiedlichen Typen/Erregerstämmen können Rückschlüsse auf die räumliche Struktur gezogen werden.
- 4) Es genügen geringe Mengen wenig konzentrierten Zielmoleküls, eine vorhergehende Reinigung ist nicht nötig, wodurch das Zielmolekül auch unter nahezu nativen physiologischen Bedingungen analysiert werden kann.
- 5) Gegenüber etablierten Verfahren zur PrP^{Sc} Typisierung (Westernblot) erlaubt das Verfahren einen schnellen Test in einem homogenen Assay, so dass eine große Probenzahl analysiert werden kann (diagnostisches oder Wirkstoff-Screening).

4. Weitere Anwendungsbereiche

Das erfindungsgemäße Verfahren ist grundsätzlich nicht auf die unter Punkt 3. beschriebene konkrete Anwendung im Bereich der Typisierung verschiedener Prion-Stämme beschränkt. Grundsätzlich ist eine Analyse verschiedenster subzellulärer

Partikel möglich, die sich mit fluoreszenzmarkierten Sonden markieren lassen. Die Vorteile, die unter Punkt 3. aufgeführt wurden, gelten hier analog. Insbesondere sind folgende Einsatzfelder zu nennen:

- a) Im Bereich der Prionkrankheiten ist neben der Erregerstammtypisierung die relative Bindung von PrP^c verschiedener Spezies an Prionproteinaggregate einer bestimmten Spezies untersuchbar, was eine Abschätzung der jeweiligen Speziesbarriere für eine Krankheitsübertragung ermöglicht.
- b) Andere (neuro-)degenerative Krankheiten mit Bildung amyloidartiger pathologischer Aggregate wie insbesondere der Morbus Alzheimer sind analog untersuchbar. Auch hier werden Subtypen pathologischer Aggregate mit potentiell unterschiedlicher diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Bedeutung erkennbar.
- c) Andere subzelluläre Partikel werden analog untersuchbar, bis hin zur phänotypischen Analyse viraler Partikel.

Figur 1 zeigt Zweifarben-Intensitätshistogramme von humanem PrPSc Typ 1 und Typ 2

PrP-Material: Menschliches PrPSc wurde uns von der Arbeitsgruppe Prof. Gambetti (Cleveland) zur Verfügung gestellt. Anhand dieses Materials wurden die unterschiedlichen Subtypen der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung wurden durch Parchi et al. (1997) durch konventionelle Methoden nach Straintypen (1/2) und den Polymorphismus am Codon 129 des humanen Prionproteins differenziert.

Fluoreszenzmarkierte Proben:

Als Sonden wurden monoklonale Antikörper gegen das Prionprotein mit fluoreszenzfarbstoffen markiert. PrP (AA 142-160) spezifischer Antikörper 12F10 (Krasemann 1996) (Institut für Bioanalytik, Heiligenstadt) wurde mit durch Protein G Affinitätschromatografie (AB purification Kit, Pharmacia) aus serumfreiem Zellkulturüberstand aufgereinigt und mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (AB labeling Kit, Amersham) markiert.

PrP (AA 214-230) spezifischer Antikörper pri917 wurde durch den Service de Pharmacologie et Immunologie (CEA, Saclay, France) zur Verfügung gestellt. Er wurde mit dem grünen Farbstoff Alexa488 (Molecular Probes) markiert.

Für die Messung wurde PrP-Material 1:10 in PBS + 0.1% NP-40 (Sigma) verdünnt und fluoreszenzmarkierte Sonden mit einer Endkonzentration von $c(12F10) = 12$ nM und $c(pri917) = 9$ nM zugegeben.

SIFT-Setup:

Die Messung erfolgte in einem Zweifarben FCS Gerät (ConfoCor Prototyp, C. Zeiss, Jena). Das konfokale Detektionsvolumen wurde durch die übereinanderliegenden Foci eines HeNe-Lasers (633nm) und eines Ar⁺ Lasers (488nm) gebildet, die durch ein Mikroskopobjektiv in die Messkapillare fokussiert wurden. Größe und Form des Detektionsvolumens wurden durch Autokorrelationsmessungen mit einer Rhodamin Green Farbstofflösung bestimmt. Das Messgerät war mit einem Positioniertisch ausgestattet (Märzhäuser, Wetzlar), der es erlaubte, die Probe mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s während der Messung abzufahren. Die Messung erfolgte 600s bei 22°C. Das Fluoreszenzsignal beider Kanäle wurde in einer Mehrkanal-Zählerkarte über Intervalle von 500 μ s summiert. Die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Zahl an Photonen beider Kanäle auftrat wurde in einem zweidimensionalen Intensitätshistogramm gespeichert.

Figur 2 zeigt die relative Verteilung des Signals der gebundenen PrP spezifischen Sonden

(12F10-Cy5) und (pri917-Alexa488) für menschliches PrPSc (129 M/M) Typ 1 und PrPSc (129 M/M) Typ 2. Im Signal des MM1 PrP ist der Anteil beider Sonden annähernd gleich während das Signal der MM2 Aggregate weniger als 20% rotes (12F10) Signal enthält.

Quantitative Auswertung:

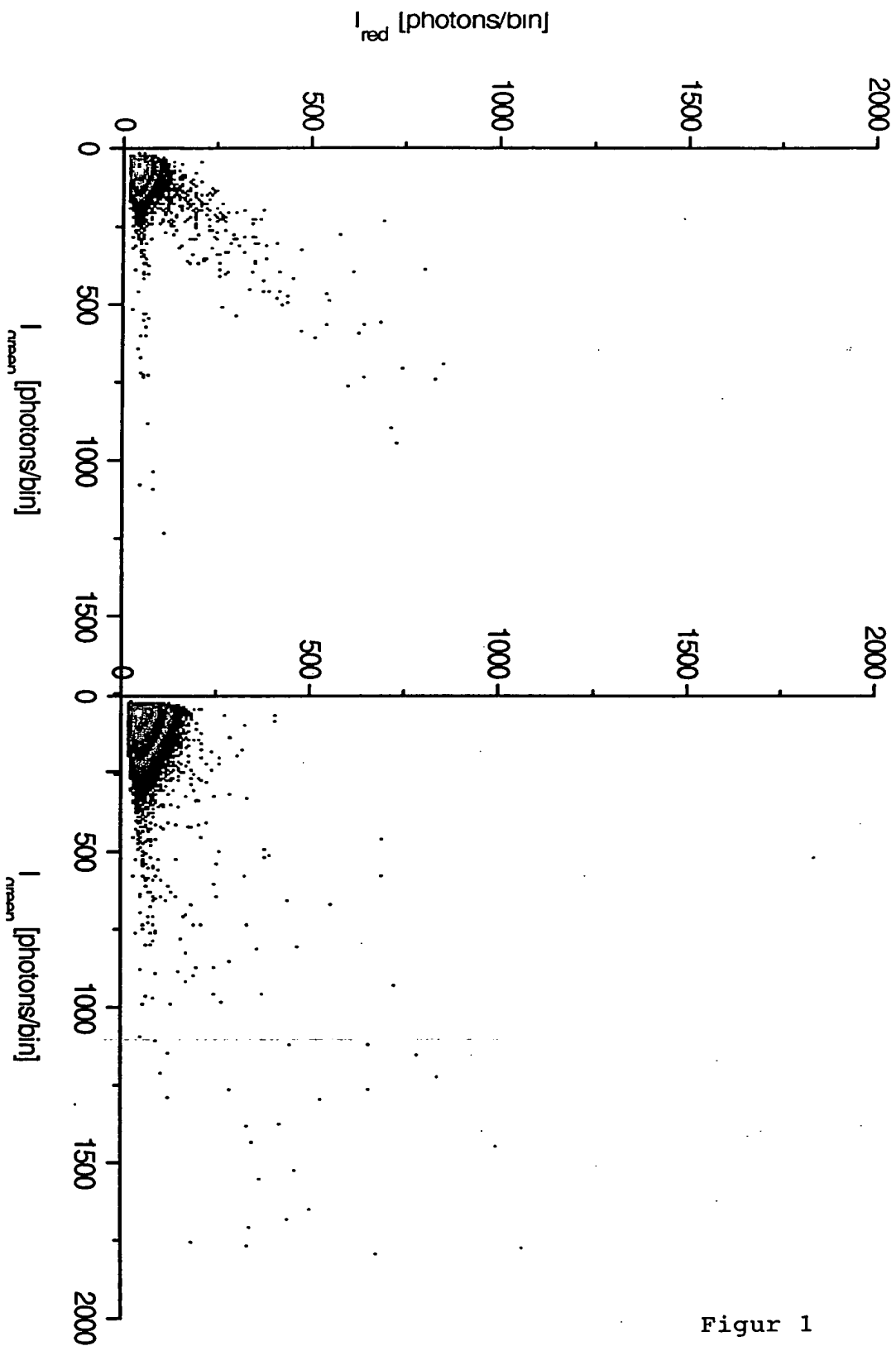
Um die relative Bindung der Antikörpersonden am PrP-target zu quantifizieren wurde die relativen Anteile des grünen und roten Fluoreszenzsignal am hochintensen Signal der SIFT Messung bestimmt. In einem ersten Schritt wurde das Maximum der zweidimensionalen Intensitätsverteilung bestimmt (I_{\max}). Das Signal der freien Sonden wurde durch eine Schwelle von $6 \cdot I_{\max}$ vom hochintensen Signal abgetrennt. Das Intensitätshistogramm wurde entsprechend dem relativen Signal der roten und der grünen Sonden in Sektoren aufgeteilt, in denen die Zahl der hochintensen Messkanäle summiert wurde.

Patentanspruch

1. Verfahren zur Charakterisierung pathologischer Proteinablagerungen, insbesondere Prionproteine nach Subspezies durch deren Markierung mit Sondenmolekülen, wobei die Bindung mindestens zweier unterschiedlicher Sondenmoleküle an die Proteinablagerungen bildenden Proteine oder Aggregate, insbesondere Prionproteine detektiert wird und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt wird.

Zusammenfassung

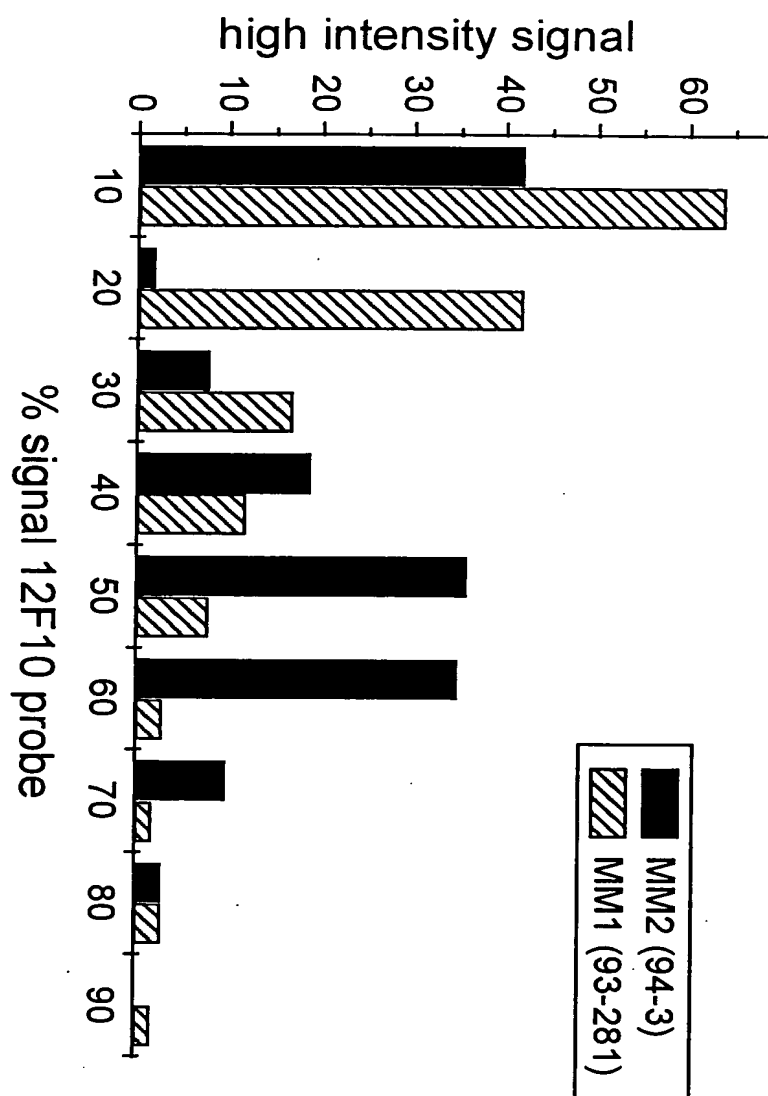
Verfahren zur Charakterisierung pathologischer Proteinablagerungen, insbesondere Prionproteine nach Subspezies durch deren Markierung mit Sondenmolekülen, wobei die Bindung mindestens zweier unterschiedlicher Sondenmolekülen an die Proteinablagerungen bildenden Proteine oder Aggregate, insbesondere Prionproteine detektiert wird und aus dem Verhältnis der gebundenen Mengen an verschiedenen Sondenmolekülen zueinander die Subspezies bestimmt wird.



human PrPSc 129(M/M) type 2 (94-3)
probes: mAB 917 (green) mAB 12F10 (red)

human PrPSc 129(M/M) type 1 (93-281)

Figur 1



Figur 2